



УДК 577.112.6:577.152.344'17

СИНТЕЗ ПЕПТИДОВ, КАТАЛИЗИРУЕМЫЙ ФИЦИНОМ

Шустер Ю., Митин Ю. В., Якушке Г.-Д.**

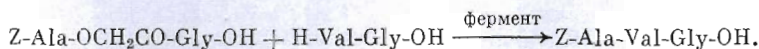
Институт белка Академии наук СССР, Пушкино Московской обл.;

** Университет им. К. Маркса, Лейпциг, ГДР*

Исследован катализируемый фицином синтез модельного пептида Z-Ala-Val-Gly-OH в фосфатном буфере. В качестве карбоксильного компонента использованы водорастворимые эфиры. Z-Ala-OCH₂CO-Gly-OH и Z-Ala-OCH₂CO-NHC₂H₄SO₃Na. Найдено, что максимальный выход пептида получается при pH 8–9. Изучено также влияние концентрации компонентов и температуры на выход модельного пептида.

Тиоловая протеиназа папаин (КФ 3.4.22.2) с успехом применяется для синтеза различных пептидов [1–4]. Широкая специфичность этого фермента позволяет синтезировать пептиды, состоящие из любых природных аминокислот, кроме пролина. Ближайшим родственником папаина является фицин (КФ 3.4.22.3), выделяемый из инжира [5]. Фицин, как протеолитический фермент, по ряду свойств очень похож на папаин. Можно предполагать, что фицин подобно папаину будет так же успешно катализировать синтез пептидов.

Мы изучили поведение фицина в условиях, приводящих к синтезу пептидной связи, на примере модельного пептида Z-Ala-Val-Gly-OH. В качестве карбоксильного компонента мы использовали водорастворимый гликолилглициновый эфир карбобензоксипаланина, хорошо зарекомендовавший себя в синтезе пептидов, катализируемом папаином [6, 7]. Синтез пептидов протекает по схеме



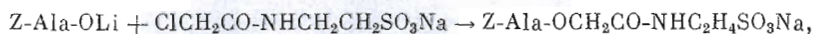
Кроме того, мы использовали другой водорастворимый эфир, содержащий остаток гликолилтаурина: Z-Ala-OCH₂CO-NHC₂H₄SO₃⁻ [7, 8].

При определении оптимального значения pH среды реакции мы нашли, что максимальный выход получается в интервале pH 8–9 (рис. 1). Аналогичная величина получена ранее для папаина [4, 7]. Что касается влияния температуры, то фицин более термостабилен, чем папаин. Синтез пептидов, катализируемый фицином, можно вести даже при 60°С, в то время как паин при температурах выше 50°С быстро инактивируется [4] (рис. 2).

Соотношение концентраций карбоксильного и аминокислотного компонента оказывает сильное влияние на выход пептида (рис. 3), причем избыток аминокислотного компонента сильнее сказывается на увеличении выхода пептида, чем в случае папаина [7].

Интересно отметить заметное влияние ионной силы на результат реакции (рис. 4).

При сравнении результатов использования гликолилглицинового и гликолилтауринового эфиров, видно, что предпочтение следует отдать первому. Синтез пептида в случае гликолилглицинового эфира протекает в несколько раз быстрее, хотя конечный выход пептида одинаков в обоих случаях. Более того, уже отмечалось [7], что, хотя синтез гликолилтауриновых эфиров можно осуществить в одну стадию, исходя из хлорацетилтаурина, например



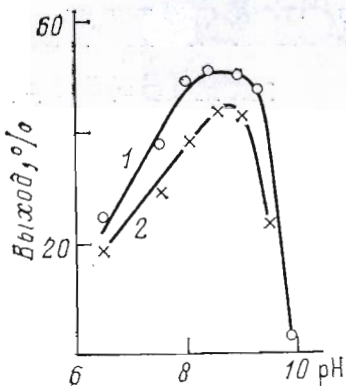


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость выхода Z-Ala-Val-Gly-OH от pH при реакции Val-Gly (0,05 M Val-Gly, $2 \cdot 10^{-4}$ M **фицин**, 0,1 M **К-фосфатный** буфер, $\sim 20^\circ\text{C}$) с Z-Ala-OCH₂CO-Gly-OH (0,1 M, 25 мин) (1) и Z-Ala-OCH₂CO-NHC₂H₄SO₃⁻ (0,075 M, 70 мин) (2)

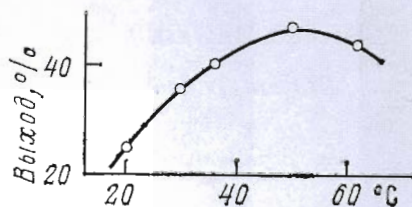


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость выхода пептида от температуры реакции Z-Ala-OCH₂CO-Gly-OH с Val-Gly при pH 8 (10 мин). Остальные условия – см. рис. 1

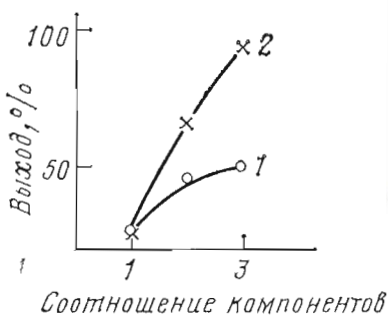


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость выхода Z-Ala-Val-Gly-OH от соотношения компонентов в реакции Z-Ala-OCH₂CO-Gly-OH с Val-Gly (pH 8,0, остальные условия – см. рис. 1) при избытке (моль/моль) карбоксильного (1) и аминоконпонента (2)

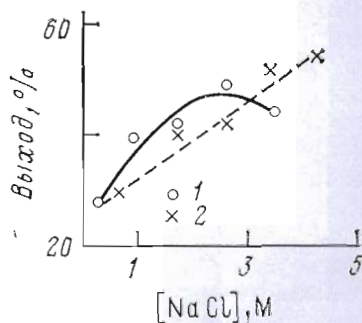


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость выхода Z-Ala-Val-Gly-OH от ионной силы при реакции Val-Gly с Z-Ala-OCH₂CO-Gly-OH (pH 8,0) (1) и Z-Ala-OCH₂CO-NHC₂H₄SO₃⁻ (pH 8,5) (2). Условия – см. рис. 1

выделение и работа с ними затруднены вследствие его гигроскопичной, аморфной природы.

Разумеется, **фицин**, как и **папаин**, можно использовать при синтезе пептидов, исходя из метиловых или других алкиловых эфиров. Но при этом необходимо добавлять органические растворители (спирты, ацетонитрил и т. д.), чтобы перевести взятый эфир хотя бы частично в раствор.

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что в пептидном синтезе **фицин** ведет себя подобно **папаину**, являясь в то же время более термостабильным.

Экспериментальная часть

В работе использовали **фицин** (Calbiochem-Boehringer, Австрия) без дополнительной очистки, дитиотреит (Reanal, ВНР), флуорескамин (Fluka, Швейцария). Синтез аминоконпонента H-Val-Gly-OH проводили по описанной методике [9].

Синтез пептидов осуществляли в 0,1 M **К-фосфатном** буфере при заданном значении pH с использованием 0,1 M Z-Ala-OCH₂CO-Gly-OH (или 0,075 M Z-Ala-OCH₂CO-NHC₂H₄SO₃⁻Na), 0,05 M H-Val-Gly-OH, $2 \cdot 10^{-4}$ M **фицина** и 0,1 M дитиотреита.

Выход пептида рассчитывали по количеству оставшегося аминокомпонента.

Концентрацию аминокомпонента определяли с помощью флуорескамина, используя спектрофотометр Spexord UV VIS (ГДР). В кювету вносили 0,2 мл 10 мМ раствора триэтиламина в метаноле, 4 мкл реакционной смеси и 0,05 мл 10 мМ раствора флуорескамина в ацетоне, смесь тщательно перемешивали, затем через 1 мин добавляли 1,75 мл метанола, перемешивали и измеряли оптическое поглощение при 389 нм. Величина поглощения имеет линейную зависимость от концентрации H-Val-Gly-OH (ϵ 4823).

ЛИТЕРАТУРА

1. Isowa Y., Ohmori M., Ichekawa T., Kurida H., Sato M., Mori K. // Bull. Chem. Soc. Japan. 1977. V. 50. № 10. P. 2762-2765.
2. Tsuzuki H., Oka T., Morihara K. // J. Biochem. 1980. V. 88. № 3. P. 669-675.
3. Döring C., Kuhl P., Jakubke H.-D. // Monatsh. Chem. 1981. V. 112. № 10. P. 1165-1173.
4. Mitin Yu. V., Zapevalova N. P., Gorbunova E. Yu. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1984. V. 23. № 5. P. 528-534.
5. Hollaway M. R., Hardman M. J. // Eur. J. Biochem. 1973. V. 32. № 3. P. 537-546.
6. Митин Ю. В., Горбунова Е. Ю., Огий С. А., Куль П. // Биооргани. химия. 1985. Т. 11. № 5. С. 709-710.
7. Mitin Yu. V., Gorbunova E. Yu., Ogiy S. A. // Beitrage zur Wirkstoffforschung. 1987. Heft 30. S. 188-207.
8. Altamura M., Agues G. // J. Org. Chem. 1988. V. 53. № 6. P. 1307-1309.
9. Мурин Ю. В., Огий С. А., Тертых В. А. // Биооргани. химия. 1985. Т. 11. № 11. С. 1476-1480.

Поступила в редакцию
4.VII.1988
После доработки
28.VIII.1988

PEPTIDE SYNTHESIS CATALYZED BY FICIN

SCHUSTER Ju., MITIN Yu. V.*, JAKUBKE H.-D.

Karl-Marx-Universität, Leipzig, GDR;

** Institute of Protein Research, Academy of Sciences of the USSR,
Pushchino, Moscow Region*

Synthesis of a model peptide Z-Ala-Val-Gly-OH catalyzed by ficin in phosphate buffer was studied with water-soluble esters Z-Ala-OCH₂CO-Gly-OH and Z-Ala-OCH₂CO-NHC₂H₄SO₃Na as carboxyl components. The maximal yield of the peptide was obtained at pH 8-9. The effect of temperature and concentration of reagents was studied in the model reaction.